PRODUCTION OF CHONDROITIN SULFURIC ACID DECOMPOSITION PRODUCT BY IMMOBILIZED MOLD

Publication number: JP62130696 Publication date: 1987-06-12

Inventor:

KIMURA HIKARI; MURATA KOSAKU; NONAKA

MICHIO; SATO NOBUYUKI

Applicant:

TAIYO FISHERY CO LTD

Classification:

- international: C12N11/04; C12P19/04; C12P19/26; C12R1/01;

C12R1/20; C12R1/37; C12R1/38; C12R1/44; C12R1/445; C12N11/00; C12P19/00; (IPC1-7): C12N11/04; C12P19/04; C12P19/26; C12R1/01; C12R1/20; C12R1/37; C12R1/38; C12R1/44

- european:

Application number: JP19850270745 19851203 Priority number(s): JP19850270745 19851203

Report a data error here

Abstract of JP62130696

PURPOSE:To eliminate a purifying process of enzyme, to recover an immobilized mold and to reuse it, by bringing the immobilized mold of a bacterium containing an enzyme capable of decomposing chondroitin sulfuric acid into contact with chondroitin sulfuric acid and separating a formed chondroitin sulfuric acid decomposition product. CONSTITUTION:A mold obtained by growing a bacterium such as Proteus vulgaris, etc., containing an enzyme capable of decomposing chondroitin sulfuric acid in a nutritive medium or a mold obtained by further treating the mold in a derived medium is immobilized, hardened and molds between lattices are destroyed by a physical and chemical means. The immobilized mold is brought into contact with chondroitin sulfuric acid and a chondroitin sulfuric acid decomposition product is obtained. A solution having finished the reaction or a column effluent is passed through a molecular sieve and unreacted chondroitin sulfuric acid, etc., are readily separated.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

(b)

3 3

(B2) 糍 4 盐 华 (2)

厅内整理番号 7432-4B 凝別記号

平成5年(1993)8月27日

800公告

19/26 19/26 1:37) 19/26 19/26 1:20)

(全5頁) 発明の数 1

> 固定化関体によるコンドロイチン硫酸分解物の製法 69発明の名称

@昭62(1987) 6 月12日 1882-130696 ₹**6** 昭60(1985)12月3日 昭60-270745 新 60 60 60 60

東京都中央区月島3-2-9 大洋漁業株式会社大洋研究 東京都中央区月島3-2-9 大洋漁業株式会社大洋研究 東京都千代田区大手町1丁目1番2号 京都府京都市下京区若宮通六条上1281 京都府京都市山科区櫃川町3-35 外3名 配 光作 ** 午 往朗博 大洋漁業株式会 掛 煙 印 K 弁理士 青 田中 * 놴 舯 \prec 墨 明明 の発 (D)(A)

の特件場状の物理

イチン硫酸分解酵素含有微生物の固定化菌体とコ ロイチン硫酸分解物を分離することを特徴とす プロテウス属 (Proteus)、スタフイロコツ カス属 (Staphylococcus) またはフラボバクテ リウム属 (Fravobacterium) に属するユンニ 14日 ンドロイチン硫酸とを接触させ、生成するコン る、コンドロイチン硫酸分解物の製法。

クリルアミドゲル、光硬化樹脂、アルギン酸カル シウム、カラギーナンまたは寒天である特許請求 2 前紀の固定化菌体の固定化用担体が、ポリア の範囲第1項記載の方法。

栄養培地で生育した関体をコンドロイチン硫酸存 3 前記のコンドロイチン硫酸分解酵素含有微生 物が、栄養培地で生育した菌体であるか、または 在下で再培養した菌体である特許請求の範囲第1

4 哲配の固定化超体とコンドロイチン操製とを マグネシウムイオン存在下で接触させる特許罰求

の範囲第1項記載の方法。

前記の固定化菌体をカラムに充塡し、コンド ロイチン硫酸と連続的に接触させる特許請求の範 田第1項記載の方法。

発明の評価な説明

(産業上の利用分野)

ン硫酸を酵素的に分解し、その分解生成物を製造 本発明は、固定化菌体を使用してコンドロイチ する方法に関する。

〔従来の技術〕

で、Dーグルクロン酸とNーアセチルガラクトサ ミンとの縮合体である二糖を繰返し単位とするポ パク質と共有結合を形成し、軟骨組織のほか血管 コンドロイチン硫酸は硫酸化ムコ多糖の一種 リマーである。その性状の差により、コンドロイ チン硫酸C等に分類されている。コンドロイチン 壁や腿などの結合組織に合まれ、重要な機能をも ナン硫酸A、コンドロイチン硫酸B、コンドロイ 硫酸は、通常、動物の生体内で生合成され、タン っている。 10 12

としては、例えば、プロテウス属 (Proteus) の

本発明において、コンドロイチン硫酸分解酵素

舗菌倒えばプロテウス・ブルガリス (P. vulgaris) またはプロテウス・ミラビリス (P.

コンドロイチン硫酸は分子内に多量の硫酸残基

20

(Pseudmonas) の細菌例えばシュードモナス・ 既 (Aeromonas) の細菌が含まれる。好ましい thetaiotaomicron)、シュードモナス原 フルオレセンス (P.fluorescens)、エアロモナス **匍茵はプロテウス・ブルガリスまたはフラボバク** テロイデス・セタイオタオニクロン (B. 45 製する場合には、各種細菌の菌体や培養液から精 **精製したヒアルロニダーゼ等のコンドロイチン硫** 質を利用して、コンドロイチン硫酸の中途分解生 をもつているので、界面活性作用を示す。この性 従来、コンドロイチン硫酸中途分解生成物を調 **製したコンドロイチナーぜや、コウ丸抽出液から** 成物が注射剤や点眼剤等に広く使用されている。

テリウム・ヘパリヌムであり、特にはプロテウ 固定化する前に前配微生物を増殖させる場合に ス・ブルガリスが好ましい。 10 しかしながら、従来の製法においては、菌体や 敵分解酵素精製物が使用されていた。 (発明が解決しようとする問題点)

は、栄養培地を使用する。プロテウス・ブルガリ スの場合には、例えば、グルコース0.1~1%好 ~2%および食塩0.2~1%好ましくは0.5~1% 15 を含有する培養液を使用する。前配の栄養培地の ることができる。前記の栄養培地の肘を6~8好 20~40℃好ましくは約30℃で10~24時間特には12 ~16時間振盪培養し、得られる培養液を遠心分離 くは1~2% ペプトン0.5~4%好ましくは1 組成は、使用する微生物の種類に応じて変化させ ましくは6.5~7.5に調製し、微生物を接種して、 ましくは0.2~0.5%、酵母エキス0.1~4%好まし 20 培養液または抽出液等からの酵素精製が煩雑ご。 費用がかかること、精製酵素は一般に不安定で取。 扱いが不便なこと、更には、情報群素によるコンニ で酵素の再使用ができず不経済にあること等の次 ドロイチン硫酸の分解反応を回分法で実施するの 本発明の目的は、前配の欠点を解消した、コン ドロイチン硫酸分解生成物の新規な製法を提供す

して菌体を集める。

前記の目的は、コンドロイチン硫酸分解酵素含

(問題点を解決するための手段)

ることにある。

接触させ、生成するコンドロイチン硫酸分解物を

有微生物の固定化菌体とコンドロイチン硫酸とを

分離することからなる方法によつて達成すること

がてきる。

本男細書において「コンドロイチン硫酸」と

4または6硫酸とがβー1,3結合したものを構 成単位とするポリマーであり、コンドロイチン硫

は、グルクロン酸とNーアセチルガラクトサミン

コンドロイチン硫酸C、更にはコンドロイチンポ

り硫酸すなわちコンドロイチン硫酸D、Eおよび

Kが含まれる。

酸A、コンドロイチン硫酸B(デルマタン硫酸)、

ることもできるが、栄養培地で生育させただけの とが好ましい。この目的のために使用する培地 を、以下「誘導培地」と称する。誘導培地は、基 本的にはコンドロイチン硫酸および適当な窒素感 ば、第一リン酸カリウム0.1~2%好ましくは約 0.7%、第二リン酸カリウム0.1~1%好ましくは くは約0.01%、ペプトン0.01~1.0%好ましくは約 こうして得られる菌体を、後述する方法で固定 圏体がもつコンドロイチン硫酸分解活性は一般に 低いので、前記の菌体をコンドロイチン硫酸の存 等を含んでいる。誘導培地の組成としては、例え 化して本発明方法における酵素反応に直接使用す 在下で更に培養して、前記の酵素活性を高めるこ 約0.3%、硫酸アンモニウム0.05~1%好ましく は約0.1%、硫酸マグネシウム0.005~0.5%好まし %およびコンドロイチン協働0.05~2%好ましく 0.1%、ニコチン酸0.001~ 1 %好ましくは約0.001 25 30 含有微生物は公知のものを使用する。その微生物 35

約12時間振盪処理し、遠心分離によって目的の菌 は約0.3%からなり、凡約7.0~8.0に調製したもの 配の誘導培制100m中に整衡させる。この額体懸 動液を20~37℃特には約30℃で1~24時間特には が好適である。前記の栄養培地で生育させて収集 した菌体1~209特には5~10g(湿重量)を前 (Flavobacterium) の細菌倒えばフラボハクテリ 40

ウム・ヘパリヌム (F.heparinum)、スタフイロ

コッカス属 (Saphylococcus) の細菌例えばスタ

フイロコツカス・オーレウス (S.aureus)、パク テロイデス属 (Bacteroides) の価語例えばパク

mirabilis)、フラボバクテリウム風

-217-

2222222

ဝဝ္ဝဝ္ဝဝ

DInt. CI.

20 とする分解生成物の収量も高いが、回分法でしか 塩酸級衝液に懸濁させ、適当な物理化学的処理例 えば音波処理またはトルエン処理によつて簡体を 生成物を得ることができる。この方法は、従来の 利用できず、前記処理菌体の回収再使用も実質的 栄養培地で生育させた関体、または更に誘導格 地で処理した菌体を、適当な緩衝液例えばトリス 破壊し、この物理化学的処理菌体をコンドロイチ ン硫酸と接触させても、コンドロイチン硫酸分解 骨製酵素を使用する方法よりは煩雑でなく、目的 に不可能たある。

リアクリルアミドゲル、光硬化樹脂、アルギン酸 本発明においては、固定化用の担体として、ボ カルシウム、カラギーナンまたは寒天を使用す る。好ましい担体はカラギーナンである。 本発明では、前記の菌体を固定化する。

15

8 35 25 8 0.9%生理食塩水にカラギーナンを絡かして0.8~ ギーナンを担体として使用する場合には以下の方 させることにより、例えば1辺1~2両の立方体 本発明においては、前記の担体を使用し、それ 自体公知の方法で菌体を固定化する。例えばカラ 法で固定化する。栄養培地で生育させた菌体、ま 1.29/11 (湿重量)の濃度で0.8~0.9%生理食塩 **长に駁倒し、40~50℃に加強する。一方、0.8~** 0.9%容液を調整し、40~20℃に加温してから前 記の菌体懸濁液中に約1:1の容量比で手早く加 えて均一な懸濁液とする。この混合懸濁液を前配 の温度に維持しながら注射器で吸い取り、20~25 ドすると、直径2~3幅のピーズ形ゲル状固定化 菌体を得ることができる。あるいは、前記の混合 2%KG/035M KPB(H1.0) 路液中かゲッ化 たは好ましくは誘導培地で処理した菌体を、1~ 懸濁液を適当な容器に入れ、氷水浴で冷却して、 形のゲル状固定化菌体を得ることができる。

が溜出するのを防止するために、前記のゲル状固 ジアミンおよび2%KCIを含むリン酸塩級衝液 (別約7)に、前記のゲル状固定化菌体を0.1~ 0.59/4の徴度で整備し、静かに機件しながら 0~30℃で5~20分間処理する。続いて、アルデ 次にゲル格子からコンドロイチン硫酸分解酵素 定化菌体を硬化処理する。8 mMヘキサメチレン こド化合物例えばジアルデヒドスターチおよび25

衛液に対して1/25~1/30容)加えて更に0.5~2 時間攪拌を続ける。こうして硬化固定化菌体を得 -30%グルタルアルデヒド木溶液を少量(倒配鹽

は、トルエン処理を行うことなく、自己熔菌を利 硫酸との接触が必ずしも充分ではない。そこで格 る菌体は崩壊されていないので、コンドロイチン 子内の菌体を物理化学的手段で破壊し、固定化菌 体の分解活性を高めることが好ましい。 菌体の破 墩は、例えば、トルエン1~20容量%好ましくは 8~10浴園%とコンドロイチン強腰0.1~ 1%炉 前記の固定化菌体を0.1~0.5g/***の嚢度で懸濁 し、約0℃において0.5~3時間好ましくは30分 **耐敵しく攪拌することによつて実施する。あるい** 前記の硬化固定化菌体の格子内に包括されてい ましくは約0.5%とを含有するリン酸塩緩衝液に、 用して温和に溶菌させる方法もある。

こうして得られた固定化菌体は、コンドロイチ に洗浄してから、再び同じ緩衝液に浸漬し、約4 Cで保存する。こうして、コンドロイチン硫酸分 ン硫酸0.3~0.5%を含むトリス塩酸級衝液で充分 解活性の非常に高い固定化菌体が得られる。

させるコンドロイチン硫酸は、精製されたもので 本発明方法において、前記の固定化菌体と接触 ある必要はなく、部分精製物でもよい。

ム50mMを存在させることが好ましい。 あるい は、固定化菌体をカラムに充塡し、コンドロイチ との接触は、回分法または連続法のいずれでも行 ン酸塩緩衝液 (元6~ 9、好ましくは約8) 中 に、固定化菌体59 (固定化処理前の湿菌体験 グネシウムイオン存在下で両者を接触させると醇 素活性が向上し、一発には例えば塩化マグネシウ 本発明による固定化菌体とコンドロイチン硫酸 うことができる。回分法においては、例えば、リ 0.1M KPB 5 44の割合で両者を懸飾させ、20~ /硫酸0.1~3%好ましくは0.5~1%を含むリン 40℃好ましくは約35℃で、空間速度 (S.V.) 0.1 ~2(時間)-1好ましくは空間速度約0.5(時間)-1 で選続的に導通流下させることにより、コンドロ 本発明方法によつて得られるコンドロイチン硫 **鞍塩級衝液 (H16~9、好ましくは約8)を20~** 草)に対して0.1~3%コンドロイチン硫酸/ 10℃好ましくは30~35℃で浸漉する。その際、 イチン硫酸分解生成物を得ることができる。

独分解生成物は、各種の硫酸化オリゴ糖、硫酸化 一糖、およびそれらの混合物である。

ックスG-50に導通することによって未反応のコ コンドロイチン確酸分解生成物は、反応終了液 またはカラム液出液を分子ふるい例えばセフアデ ンドロイチン硫酸等と容易に分離することができ る。回分法で使用した固定化菌体は分離後再回収 して再使用することができる。

以下、実施例によって本発明を更に詳細に説明 するが、本発明はこれらの実施例によって限定さ れるものではない。 (実施例)

地(グルコース0.1%、食塩0.5%、酵母エキス0.5 15 敷カルシウム緩衝液114中で37℃において1時間 35 ウム0.7%、第一リン酸カリウム0.3%、硫酸アン 20 の一部分 (1g) を10mMトリス塩酸緩衝液 (FI %およびペプトン1%含有: HI7.2) 1000m4中で 30℃において20時間振盪培養した。関体を遠心分 にトルエン0.1mを加え、30℃で10分間散しく概 プロテウス・ブルガリスNCTC4636を栄養培 得られた遺菌体59を誘導培地 (第二リン酸カリ ン硫酸0.3%含有)1000以中に移し、30℃で12時 枠してトルエン処理菌体を得た。前配の音波処理 離によって集め、0.85%冷生理食塩水で洗浄し、 モニウム0.1%、硫酸マグネシウム0.01%、ペブ トン0.1%、ニコチン酸0.1%およびコンドロイチ 間接避堵養した。遠心分離によつて集めた湿菌体 7.0) 2 m 中に動通し、90KHzで 0 でか 5 分間治 被処理して藺体破砕物を得た。また、前配の誘導 処理後の温笛体の他の一部分 (0.5g) を10mM トリス塩酸塩循液 (pH7.0) 0.5mに緊衝し、これ 菌体、トルエン処理菌体および無処理のプロテウ 各々、コンドロイチン硫酸 3 %含有の0.1M リン 反応させた。 得られた二糖の量を以下の表 1 に示 ス・ブルガリスNCTC4636生簡体(対照用)を、

€ €

特公 平 5-58716

罴

窗体处理物	二糖生成物(109/11)
生菌体	7.3
音波処理菌体	29.6
トルエン処理菌体	25.4

S

室

湿菌体5分を0.85%生理食塩水10mに竪濁し、40 同じ栄養培地で例1と同じ条件下で生育させ、得 プロテウス・ブルガリスNCTC4636を例1と られた菌体59を更に例1と同じ誘導培地に移 し、30℃で12時間振盪した。遠心分離して集めた カラギーナン3.1%溶液10㎡を調製して40℃に加 温してから前配の関体懸濁液中に手早く加えて均 一な懸濁液とした。この混合懸濁液を40℃に維持 したまま注射器で吸い取り、22℃の2%塩化カリ でに加温した。一方、0.85%生理食塩水中のkー ウム水溶液中に滴下し、直径2~3両のピーズ形 ゲル状固定化菌体を得た。 2

次に、塩化カリウム2%およびヘキサメチレン ジアミン80mMを含む0.35Mリン酸カルシウム級 **勤液 (PHT.0) 600m1に、前配のゲル状固定化菌体** 209を懸濁し、静かに機拌しながら25℃で10分間 処理した。続いて25%グルタルアルデヒド木溶液 55mを加えて更に1時間攪拌を続けて硬化させ た。トルエン 9 容量%とコンドロイチン0.5%と を含有する0.35Mリン酸カルシウム級衝液600m に前記の硬化固定化菌体209を懸濁し、0℃で20 分間厳しく提拌した。 25

こうして得られた固定化菌体0.5gを、コンド ロイチン硫酸 3 %含有の0.1Mリン酸カリウム超 節液25叫に懸濁し、37℃で反応させた。結果を 以下の表2に示す。

反応時間	二糖生成量(100/11)
0時間	0
1時間	16.4
2時間	22.5
3時間	3.62
四49	30.2

2

二種生成量(調/型)

固定化した菌体

14.6

フラボバクテリウム・ヘバリナ ム(Fravobacterium hepari num)ATCC 13125

5

2.7

アルスロ・オールスセンス (Arthro aurscens)!AN 11065

前配例2で特た固定化菌体0.5gを、コンドロイチン硫酸5%と種々の濃度の塩化マグネシウムとを含む0.1Mリン酸カリウム緩衝液 (州7.0) 2.5 J中に懸濁し、37℃で10分間反応させたところ、以下の表3に示すともりの結果が持られた。

ьb

二糖生成量 (109/101)	20.4	26.5	31.3	43.3	36.4
塩化マグネシウムの濃度 (画)	0	0	8	25	100

し、コンドロイチン硫酸 1%と塩化マグネシウム 50mMとを含む0.1Mリン酸カリウム級衝液(Fi

7.0)を35℃で種々の空間速度で連続的に導通し

た。結果を以下の表5に示す。

15

前記例2で得た固定化菌体10mをカラムに充填

氢

22

7

プロテウス・ブルガリスNCTC4638の代わりに以下の表々に配載の細菌を使用すること以外は、前配例3に記載の方法によって固定化菌体を 20 調製し、その固定化菌体を例2と同じ条件でコンドロイチン破酸と1時間反応させた。結果を以下の表々に示す。

łR

空間速度(時間-1) 二幡生成量(mg/ml) 0.1 14.8 0.3 13.6 1 10.2 2 4.3

(発明の効果)

本発明による固定化菌体は、前配のとおり、高25 いコンドロイチン硫酸分解酵素活性を示す。これは、基質であるコンドロイチン硫酸が分子量の大きな高分子物質であるにもかかわらず、本発明の固定化菌体の格子を通過することによるものであり、予想外のことである。

本発明によれば、煩雑な酵素精製工程が不要となり、固定化菌体は安定で取扱い上便利であり、 回収して再使用が可能であり、更に、連続法に使用できる等の利点をもつ。